

李 栋, 纪春艳, 王振中. 水稻叶片质膜蛋白的提取与纯化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 44–46.

水稻叶片质膜蛋白的提取与纯化

李 栋^{1,2}, 纪春艳¹, 王振中¹

(1. 华南农业大学植物病理生理学研究室, 广东广州 510642; 2. 海南医学院, 海南海口 571101)

摘要: 利用匀浆-差速离心法提取水稻叶片细胞粗膜微粒体, 采用 Dextran T-500、PEG3350 两相分配法分离纯化粗膜微粒体中的质膜, 研究不同聚合物浓度对分离效果的影响。结果表明, 采用聚合物浓度为 6.2% 的两相分配体系分配 3 次可获得纯度较高、封闭性较好的水稻叶片细胞质膜。

关键词: 水稻; 质膜; 蛋白质; 提取; 纯化

中图分类号: Q94-336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0044-02

植物细胞质膜是细胞进行内外物质交换、能量转换、信息传递等重要生命活动的关键部位。细胞质膜研究是细胞生物学、植物生理学、生物化学的重要研究领域。分离高纯度细胞质膜是进行质膜研究的前提。迄今, 关于植物细胞质膜的研究远远落后于其他细胞质膜材料的研究, 其中的一个重要原因是制备高度纯化、具有特定朝向的密实质膜囊泡比较困难。分离纯化植物细胞质膜的方法主要有蔗糖密度梯度离心法和两相分配法。两相分配法是 20 世纪 80 年代后期以来逐渐成熟的一项技术, 是按照膜表面所带电荷及疏水率的差异进行质膜分离纯化, 从而避免了由于细胞器膜大小、密度与质膜接近导致分离出的质膜纯度不高的缺陷, 大大加快了分离速度^[1]。另外, 利用两相分配法分离纯化质膜可更好地保持膜囊泡的封闭性和膜蛋白的活性, 因此该方法在质膜分离纯化研究中具有明显的优越性。但是两相分配法分离纯化质膜的过程还有待完善, 两相体系的聚合物浓度、分配条件、操作步骤等不同制备条件以及不同植物材料对质膜的分离效果都会有较大影响。本研究在国内外有关提取植物细胞质膜方法的基础上, 根据材料特点加以修改, 提取水稻叶片粗膜, 筛选适于分离纯化水稻叶片质膜的两相体系, 并对质膜纯度及质膜囊泡类型进行测定, 以期为进一步研究水稻叶片细胞质膜特性及其蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

葡聚糖 T-500 (dextran T-500), 聚乙二醇 3350 (polyethylene glycol 3350, PEG3350)。

1.2 材料

水稻品系为 C101A51, 含 pi-2 抗稻瘟病基因。

1.3 水稻叶片粗膜微粒体提取

利用匀浆-差速离心法制备水稻叶片粗微粒体膜^[2]。

采集水稻二叶期叶片加入匀浆液 [50 mmol/L Mes-Tris (pH 值 7.6), 3 mmol/L DTT, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 4 mmol/L SHAM, 1 mmol/L PMSF, 0.25 mol/L 蔗糖, 0.5% BSA (W:V), 1.5 g/L PVP], 迅速研磨, 充分匀浆后纱布过滤, 收集滤液, 取滤液于 4 ℃ 10 000 g 离心 10 min, 取上清于 4 ℃ 100 000 g 离心 40 min, 弃上清。使用粗膜悬浮液 (pH 值 7.8 的 5 mmol/L 磷酸缓冲液, 0.25 mol/L 蔗糖) 将所得沉淀悬浮, 分装, 液氮速冻, -70 ℃ 保存。

1.4 水稻叶片质膜微囊纯化^[3]

取 1 g 水稻粗膜微粒体的悬浮液加到 8 g 两相体系中 (上相为 PEG 3350, 下相为 Dextran T-500), 将两相充分混匀 (颠倒 30 ~ 40 次), 1 000 g 离心 5 min 使其分相。取上相体积的 90% (不搅动中间层) 和新鲜下相混匀, 重复上述操作 2 次, 得到的上相依次为 U1、U2、U3。将所得上相用 5 倍体积缓冲液 A (0.25 mol/L 蔗糖, pH 值 7.5 的 25 mmol/L Hepes-Bis, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF) 稀释。100 000 g 离心 45 min, 沉淀用缓冲液 A 再洗 1 次, 将所得沉淀悬浮于缓冲液 B (0.25 mol/L 蔗糖, pH 值 7.5 的 25 mmol/L Hepes-Bis, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 1 g 粗膜加缓冲液 B 0.2 mL) 中, -20 ℃ 保存。所有操作均在 4 ℃ 进行。

1.5 粗膜微粒体组分及质膜微囊纯度测定

H⁺-ATPase 是检测粗膜微粒体组分及质膜纯度的一种常用重要标记。H⁺-ATPase 有 3 种类型: P 型、V 型、F 型。质膜 H⁺-ATPase 属于 P 型, 液泡膜、内质网膜、高尔基体膜等 H⁺-ATPase 属于 V 型, 线粒体、叶绿体 H⁺-ATPase 属于 F 型, Na₃VO₄、KNO₃、NaN₃ 分别为 P 型、V 型、F 型 2 种酶的特异性抑制剂。因此可以根据 H⁺-ATPase 对这 3 种特异性抑制剂的敏感性确定提取粗膜微粒体的组分及质膜微囊的纯度^[3-6]。

取所提膜蛋白 15 ~ 30 μg, 加入酶反应液 (pH 值 6.5 的 50 mmol/L Tris-Mes, 50 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgSO₄, 3 mmol/L ATPNa₂, pH 值 6.5 的 0.1 mmol/L Na₃VO₄ 或 pH 值 8.0 的 100 mmol/L KNO₃ 或 pH 值 8.0 的 10 mmol/L NaN₃) 1 mL, 37 ℃ 下反应 45 min 后, 加入终止液 (10% 三氯乙酸) 1 mL 终止反应。然后进行显色反应: 加入显色液 [VC 1 g, (NH₄)₂MoO₄ 0.25 g, H₂SO₄ 1.72 mL, 加水定容至 70 mL]

收稿日期: 2012-12-07

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30471129)。

作者简介: 李 栋 (1978—), 女, 辽宁盘锦人, 博士, 讲师, 主要从事植物病理研究。E-mail: liliml@163.com。

通信作者: 王振中, 博士, 教授, 主要从事植物病理生理研究。E-mail: zzwang@scau.edu.cn。

1 mL, 37 °C 下反应 30 min, 冰浴 15 min 终止反应, 用核酸蛋白仪测 280 nm 下的吸光度值, 利用磷标准曲线计算酶活性^[6]。

1.6 蛋白含量测定

按 Bradford 的方法^[8]测定蛋白含量, 以 BSA 为标准蛋白。

1.7 质膜微囊方向性(微囊类型)和封闭性测定

通过反应体系中加入 Triton X-100 时 H^+ -ATPase 活性变化来鉴定提取质膜微囊的封闭性和方向性(H^+ -ATPase 酶活测定反应体系: 50 mmol/L Tris-Mes, 50 mmol/L KCl, 3 mmol/L $MgSO_4$, 3 mmol/L $ATPNa_2$, 0.1 mmol/L Na_3VO_4 , 0.01% Triton X-100, pH 值 6.5; 对照反应体系中仅不加入 Triton X-100, 其他组份不变), 即微囊类型^[6]。

正向型质膜微囊 = (Triton X-100 处理的 H^+ -ATPase 酶活 - 无 Triton X-100 处理的 H^+ -ATPase 酶活) / Tritonx-100 处理的 H^+ -ATPase 酶活^[8]。

2 结果与分析

2.1 粗膜微粒体组分分析

水稻粗膜微粒体膜对 H^+ -ATPase 各特异性抑制剂的敏感性如图 1 所示。 Na_3VO_4 、 KNO_3 、 NaN_3 对粗膜 H^+ -ATPase 酶活抑制率分别为 31.90%、28.10%、27.24%, 说明在粗膜微粒体中存在质膜、液泡膜、线粒体膜等多种膜组分。

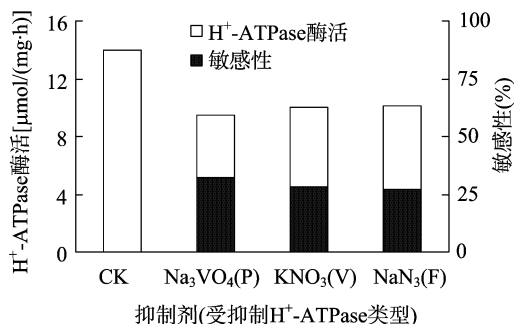


图1 粗膜组分对抑制剂敏感性测定

2.2 质膜微囊的纯化及纯度测定

2.2.1 最适两相聚合物浓度筛选 分别采用聚合物浓度为 6.0%、6.2%、6.4%、6.8% 的两相体系对水稻叶片细胞质膜进行分离纯化。通过两相分配所得质膜的蛋白产率及 H^+ -ATPase 对特异性抑制剂的敏感性来选择最适两相浓度。如图 2 所示, 随着两相体系浓度的增大, 上相蛋白产率呈下降趋势。对抑制剂的敏感性试验结果表明, 聚合物浓度在 6.8% 两相体系下所得质膜组分对 Na_3VO_4 敏感度最高, H^+ -ATPase 活性受 Na_3VO_4 的抑制率为 87.05%; 聚合物浓

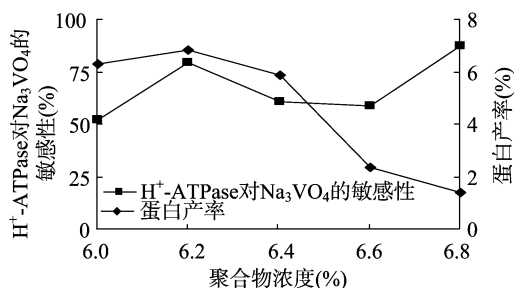


图2 不同聚合物浓度水两相体系所得质膜

度为 6.2% 两相体系下所得的质膜组分, H^+ -ATPase 活性受 Na_3VO_4 的抑制率为 79.07%。综合考虑以上因素, 认为进行水稻叶片细胞质膜分离纯化的最适聚合物浓度为 6.2% 的两相体系。

2.2.2 反复两相分配对质膜分离纯化的影响 第 1 次两相分配后所得上相(U1)经第 2 次、第 3 次两相分配, 质膜纯度进一步提高。如图 3 所示, 水稻叶片粗膜微粒体经 3 次两相分配后, 蛋白产率由 U1 的 19.71% 下降为 U3 的 4.82%; Na_3VO_4 对 H^+ -ATPase 抑制率从 U1 的 63.21% 提高到 U3 的 79.07%; KNO_3 对 H^+ -ATPase 抑制率从 U1 的 16.84% 下降到 U3 的 3.17%; NaN_3 对 H^+ -ATPase 抑制率从 U1 的 10.25% 下降到 U3 的 1.22%。表明经过 3 次两相分配所得上相主要为质膜组分, 杂质含量少, 纯度较高。

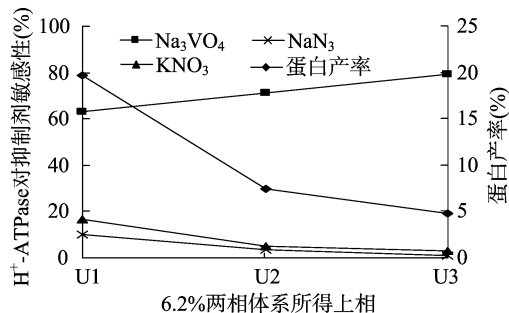


图3 反复两相分配对质膜分离纯化的影响

2.3 质膜微囊封闭性和方向性(囊泡类型)测定

以酶反应液中质膜 H^+ -ATPase 活性的变化来测定质膜微囊的封闭性和方向性(囊泡类型)。在酶反应液中无 Triton X-100 时, 质膜 H^+ -ATPase 的酶活为 2.90 $\mu\text{mol pi}/(\text{mg protein} \cdot \text{h})$ 。当酶反应液中加入 0.01% Triton X-100 时, 酶活升高到 18.55 $\mu\text{mol pi}/(\text{mg protein} \cdot \text{h})$ 。即约有 84.37% 的膜微囊为正向型质膜微囊, 反向型质膜微囊仅占约 15%。这表明两相法提取的水稻叶片细胞质膜微囊封闭性较好, 主要为正向型原位膜微囊。

3 结论与讨论

3.1 提取纯化水稻叶片质膜两相聚合物的最适浓度

两相分配法分离效果取决于聚合物浓度、盐浓度、上相和下相的比例、温度、pH 值、上样量等, 而聚合物浓度是主要影响因素, 根据材料不同所需聚合物浓度有很大差异^[9]。Hodges 等认为两相法分离草木植物质膜采用的两相浓度范围在 5.5%~7.0%, 一般在 6.0%~6.5%^[10]。本研究选用聚合物浓度为 6.0%~6.8% 进行水稻叶片质膜最适浓度筛选, 结果表明纯化水稻叶片质膜的最适两相聚合物浓度为 6.2%。

3.2 质膜微囊纯度及方向性、封闭性测定

提取高纯度质膜微囊是质膜研究的前提, 因此对所提质膜微囊进行纯度测定是必需的。质膜微囊分离纯化过程及植物材料种类等因素都影响质膜微囊的封闭性和方向性, 进而影响后续研究结果, 因此确定质膜微囊的方向性和封闭性也是必需的。 H^+ -ATPase 是质膜内在蛋白之一, 它与 ATP 的结合位点在质膜胞质一侧, 而质膜对 ATP 是不可通透的, 加入去垢剂可以使膜透性增加, ATP 可以自由通透, 从而使 H^+ -ATPase 活性增加, 因此通过 H^+ -ATPase 活性变化来鉴

尚霄丽,李 涵,张建鹏,等. 中华猕猴桃遗传转化受体系统的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):46-48.

中华猕猴桃遗传转化受体系统的建立

尚霄丽^{1,2}, 李 涵², 张建鹏², 吴春昊²

(1. 河南农业大学, 河南郑州 450002; 2. 濮阳职业技术学院, 河南濮阳 457000)

摘要:以中华猕猴桃伏牛 95-2 的组培苗叶片为外植体, 研究不同浓度生长调节剂对其愈伤组织、不定芽诱导和生根的影响及其对卡那霉素的敏感性, 从而建立高效稳定的中华猕猴桃伏牛 95-2 的受体系统。结果表明, 中华猕猴桃伏牛 95-2 的最佳愈伤组织及不定芽诱导培养基为 MS + 1.0 mg/L ZT + 0.3 mg/L NAA, 在此培养基条件下, 其不定芽分化率、每个叶盘不定芽的分化数均较高, 分别为 87.50%、4.2 个; 最佳生根培养基为 1/2MS + 2.0 mg/L NAA, 生根率达 100.00%。当卡那霉素浓度大于 10 mg/L 时, 能够明显抑制愈伤组织的生长, 且随着浓度的增加, 愈伤组织死亡率逐渐增大; 当卡那霉素浓度为 20 mg/L 时, 愈伤组织及不定芽的分化率均为 0, 因此 20 mg/L 卡那霉素浓度为中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片遗传转化的最佳筛选浓度。

关键词:中华猕猴桃; 受体系统; 卡那霉素

中图分类号: S663.403 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0046-03

猕猴桃属猕猴桃科 (Actinidiaceae) 猕猴桃属植物, 由于它们具有维生素 C 含量高、风味独特、营养丰富等优点而备受关注。中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 是猕猴桃的主要栽培种之一, 其中伏牛 95-2 品系的果肉为红色, 是特异的中华猕猴桃种质资源, 但因其具有果实小、外观差等不足, 因此有待于改良并提高其果实品质以适应市场需求。利用常规育种手段进行猕猴桃的品种改良所需的周期长、工作量大且效率低, 难以满足生产发展的需要, 而基因工程技术则为猕猴桃的种质改良开辟了一条新途径。

自 1985 年 Horsch 等发明叶盘法^[1]以来, 基因工程的转

化工作相对简化。成功的基因转化系统首先依赖良好的植物受体系统的建立, 即要求用于转化的外植体能够高效、稳定地再生无性系, 并能接受外源 DNA 的整合, 同时用于筛选的转化细胞或植株应该对抗生素具有一定的敏感性。目前有关中华猕猴桃的组织培养已有相关报道^[2-9], 但由于其再生受基因型的限制, 因此其再生体系没有普遍性, 而且不同品种间的再生效率也有很明显差异。本试验以中华猕猴桃伏牛 95-2 品系的组培苗叶片为试验材料, 建立了中华猕猴桃伏牛 95-2 的叶片基因转化的受体系统, 为进行农杆菌介导的中华猕猴桃的遗传转化奠定了基础。

收稿日期: 2012-12-05

作者简介: 尚霄丽 (1982—), 女, 河南清丰人, 博士研究生, 讲师, 从事园艺植物遗传育种教学和研究工作。E-mail: xiaoli820218@163.com。

定提取质膜微囊的封闭性和方向性。质膜微囊封闭性的计算方法为: 加入去垢剂测得的 H^+ -ATPase 酶活减去未加去垢剂时的酶活, 再除以加入去垢剂测得的 H^+ -ATPase 酶活, 该比值越大, 表明膜微囊封闭性越高, 正向型质膜微囊所占比例越高。本研究中使用 Triton X-100 处理质膜, 结果发现该比值高达 84.37%, 表明通过两相法提取的水稻叶片细胞质膜微囊封闭性好, 主要为正向型原位质膜微囊。

参考文献:

- [1] Albertsson P A, Andersson B, Larsson C, et al. Phase partition a method for purification and analysis of cell organelles and membrane vesicles[J]. *Methods of Biochemical Analysis*, 1982, 28: 115-150.
- [2] Palmgren M G, Askerlund P, Fredrikson K, et al. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: Optimal conditions for formation and separation[J]. *Plant Physiology*, 1990, 92(4): 871-880.
- [3] Sandelius A S, Morre D J, Moller I M, et al. The plant plasma membrane [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1990: 44-67.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料中华猕猴桃伏牛 95-2 (*A. chinensis* Funiu 95-

- [4] Gallagher S R, Leonard R T. Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots[J]. *Plant Physiology*, 1982, 70(5): 1335-1340.
- [5] Briskin D P, Leonard R T, Hodges T K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 542-558.
- [6] Sandstrom R P, Deboer A H, Lomax T L, et al. Latency of plasma membrane H^+ -ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning[J]. *Plant Physiol*, 1987, 85(3): 693-698.
- [7] 王建华, 陈 珈, 吴显荣. 玉米细胞两种质膜囊泡的制备和鉴别[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(5): 443-445.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [9] 王细娥, 张丽军, 谢锦云, 等. 蛋白质组研究中细胞质膜的纯化和纯度鉴定研究进展[J]. *生命科学研究*, 2006, 10(增刊): 15-20.
- [10] Hodges T K, Mills D. Isolation of plasma membrane[J]. *Methods in Enzymology*, 1986, 118: 41-54.